

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 吉田裕樹 九州保健福祉大学薬学部 講師

研究協力者： 宮内亜宜 九州保健福祉大学薬学部 助教

研究要旨

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) およびチタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) について、respiratory syncytial virus (RSV)感染マウスモデルを用いて感染病態を指標に影響評価を行った。両サンプルを複数回曝露（感染 5,3,1 日前）後、RSV をマウスに感染させた。MWNT-7 曝露マウスの感染 1 日後の肺免疫組織像では、抗 CCL 抗体 3 陽性細胞数の増加が認められたが、MWNT-7 貪食細胞とは異なっていた。感染14日後の肺組織をマッソンT染色法で解析したところ、肺胞壁の一部線維化が見られ、肺炎回復期での遅延が確認された。MWNT-7 は感染直後からマクロファージ等に影響して間接的にウイルス感染に応答した炎症形成を亢進することが示唆された。また、病態に関しても、回復期での炎症継続や肺線維化など MWNT-7 の作用が持続的であることが判明した。一方、チタン酸カリウム曝露マウスでは、感染 1 日後の肺胞洗浄液中の TNF- α など炎症性メディエーターの上昇が認められ、貪食細胞周囲での炎症形成の亢進も確認された。しかし、感染 14 日後での線維化の程度は低く、MWNT-7 の様な明確な回復遅延は見られなかった。

A. 研究目的

多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) は、その物理的特性から IC 基盤の材料などに汎用されている。その一方でマウス腹腔内投与により中皮腫

を誘導するなど、アスベスト様の生物災害を引き起こす危険性が多方面から指摘されている。チタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) もプラスチックの補強材や精密フィルターなど工業製品に多

用されているが、やはりアスベストに似た針状の構造が健康被害を引き起こす可能性が指摘されている。

本研究では、これらナノマテリアルの免疫系への影響、その中でも感染性免疫系への影響をrespiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて評価を行ってきている。そして、前年度までにMWNT-7の感染初期からの免疫担当細胞への影響と肺炎増悪化やチタン酸カリウムの肺炎増悪化について報告した。

今年度は、MWNT-7のRSウイルスの初期感染病態への影響を免疫染色法で確認すると共に、チタン酸カリウムも含めて肺炎回復期への影響をマッソントリクロム染色法で詳細に検討した。

B. 方法

RSV マウス感染実験

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) とチタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) を実験に用いた。これらの試料について、秤量後に超音波破砕機や 27G シリンジを用いて懸濁しながら段階的に希釈し、最終的に 0.02% Tween 20 -phosphate buffered saline (PBS) に均一懸濁・希釈した。ウイルス感染 5、3、1 日前に試料を 100 μ L ずつ 0.025~0.25 mg/kg になるように BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ g/g、筋注) で経鼻投与した。なお、対照には 0.02% Tween 20-PBS を投与した。曝露後、

RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下で経鼻感染させた。RSV 感染 1 および 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL3 (MIP-1 α) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットシリーズを用いた。サイトカインの定量は、Ready-Set-Go ELISA キット (eBioscience 製) を用いた。なお添付のプロトコルに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (有) ヴィペック社に委託し、評価は HE 染色下で実施した。さらにマッソントリクロム染色は常法どおりに行った。

免疫染色法

肺組織切片について、常法により脱パラフィンやアンマスキング等を実施後、抗 CCL3 抗体 (10 μ g/mL) を用いて免疫染色した。なお検出はベクスタチン ABC 検出キットを利用し、対比染色はヘマトキシリン染色を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

(1) MWNT-7 の評価結果

免疫染色による感染1日後の肺病理組織評価

RSV感染初期におけるMWNT-7の影響を見るために、感染1日後に摘出した固定肺の免疫染色を行った。非感染マウスの肺組織では、MWNT-7の曝露の有無に関わらず抗CCL3抗体陽性細胞は全く認められなかった。感染対照（非処置）では肺胞壁の肥厚と共に、CCL3発現細胞が散見された。そしてMWNT-7 0.25 mg/kg曝露マウスでは、全体的に肺胞壁が肥厚しており、CCL3発現細胞も多数認められた。しかし、MWNT-7を貪食した細胞ではCCL3の発現は見られなかった。

マッソントリクロム染色による感染14日後の肺病理組織評価

感染14日後の対照マウスでは、リンパ系細胞の浸潤などはほぼ収束しており、肺胞壁の肥厚もほとんど見られなかった。一方、MWNT-7曝露マウスでは一部で肺胞壁の軽度の肥厚と共に、線維化が確認された。また、部分的ではあるがMWNT-7を貪食したマクロファージも認められた。

(2) チタン酸カリウムの評価結果

感染初期応答への影響

RSウイルス感染1後のBALF中の炎症性のマーカーを検討した。チタン酸カリ

ウム曝露群（0.025および0.25 mg/kg）では、TNF- α 、IL-6およびCCL3の有意な上昇が認められた。また、非感染マウスではチタン酸カリウム曝露に関わらず何れも検出限界以下であった。

マッソントリクロム染色による感染14日後の肺病理組織評価

RSウイルス感染マウスでは、チタン酸カリウム 0.025 mg/kg曝露により、部分的ではあるが肺胞壁の肥厚の程度が亢進し、浸潤細胞数も増加していたが、MWNT-7曝露時のような線維化などは確認できなかった。

D. 考察

前年度報告したように、本モデルではRSウイルス感染1日後から肺の炎症惹起が認められた。MWNT-7曝露により炎症マーカーの1つであるBALF中のケモカインCCL3レベルが有意に上昇していたため、その質的な相違を見るために抗CCL3抗体を用いた免疫染色で検証した。その結果、MWNT-7によるCCL3発現細胞数の上昇が確認された。しかし、MWNT-7を貪食した細胞の周囲では、炎症は亢進しているものの、CCL3発現細胞は認められなかった。これは、MWNT-7を貪食した細胞では感染直後から強い炎症誘導の応答が生じた可能性が高いためと思われる。今後より細かく時間的な経緯を調べる必要がある。一方、回復期への影響については、肺の線維化やMWNT-7貪食細胞の検出

など、影響が持続することが示唆され、より長期に亘った影響評価を実施していきたい。

チタン酸カリウムはその特徴的な針状の構造から、MWNT-7と同様な作用が予想され、実際に感染初期から炎症性のメディエーターの上昇が確認された。しかしながら、回復期への作用はMWNT-7より軽度であり、肺組織での蓄積性などが低いことが強く示唆された。今後、感染初期からの炎症形成の相違などをMWNT-7と比較検討していく。

E. 結論

1. MWNT-7曝露マウスでは、免疫染色によりRSウイルス感染直後から強い炎症誘導が生じている可能性が示唆された。
2. マッソントリクロム染色法でMWNT-7曝露により肺炎回復期での持続的な作用と肺の線維化などが確認された。
3. チタン酸カリウムは感染初期から影響するが、MWNT-7よりは肺炎増悪化の程度が低かった。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Yoshida H, Tshako R, Atsumi T, Narumi K, Watanabe W, Sugita C, Kurokawa M. Naringenin interferes with the anti-diabetic actions of

pioglitazone via pharmacodynamic interactions, *J Nat Med*, 71 (2017) 442-448.

Hagiwara A, Hidaka M, Takeda S, Yoshida H, Kai H, Sugita C, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-Allergic Action of Aqueous Extract of *Moringa oleifera* Lam. Leaves in Mice, *Eur J Med Plants*, 16 (2016) 1-10.

2. 学会発表

加藤雄大、橋口誠子、榎藤喜貴、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸カリウム曝露のRSV肺炎への影響 第64回日本ウイルス学会総会、P2-091 札幌コンベンションセンター 2016年10月24日

榎藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 多層型カーボンナノチューブ曝露によるRSV感染初期応答への影響 第64回日本ウイルス学会総会、P2-092 札幌コンベンションセンター 2016年10月24日

寺田央子、加藤雄大、橋口誠子、榎藤喜貴、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦、渡辺 渡 チタン酸カリウム曝露のRSV肺炎への影響 日本薬学会第137年会、27PB-am155、2017年3月、仙台国際センター

渡辺 渡、榎藤喜貴、橋口誠子、加藤雄大、広瀬明彦、宮内亜宜、明石 敏、吉田裕樹、杉田千泰、黒川昌彦 多層型カーボ

ンナノチューブ曝露によるRSV感染初期
応答への影響 日本薬学会第137年会、
27PB-am154、2017年3月、仙台国際
センター

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
(予定も含む)